

原 著

接触過敏症モデル動物実験系に与える
ジニトロフルオロベンゼンの影響烏烏日娜^{*1} 武政睦子^{*2} 長野隆男^{*2}

要 約

接触過敏症（CHS）は、ヒトのアレルギー性接触皮膚炎の研究によく利用されるモデル動物実験系である。本研究では、CHS モデルマウスの耳介にチャレンジするジニトロフルオロベンゼン（DNFB）の濃度と回数の影響について検討した。まず、耳介の腫れを調べた結果、0.15%と0.3% DNFB では2回のチャレンジで、0.5% DNFB では1回のチャレンジで評価することが望ましいと考えられた。次に、耳介組織をヘマトキシリン・エオジン（HE）と免疫組織化学（IHC）を用いて染色した。IHCでは、抗 Gr-1抗体を使用して耳介組織に浸潤した炎症細胞を染色した。その結果、HE 染色では0.15%と0.3% DNFB 群で耳介組織の腫れに差は見られなかった。一方、IHC 染色では、0.3% DNFB 群は0.15% DNFB 群と比べて耳介組織に浸潤した炎症細胞の数に有意な増加がみられた。従って、抗 Gr-1抗体を使用した IHC 染色は、CHS 評価において有用な研究方法と考えられた。

1. 緒言

接触皮膚炎は、外来性の刺激物質や接触アレルギー（ハプテン）が皮膚に接触して生じた湿疹性の炎症反応と定義され、一次刺激性接触皮膚炎（irritant contact dermatitis; ICD）とアレルギー性接触皮膚炎（allergic contact dermatitis; ACD）に大別される。ICD は、皮膚に接触した刺激物質が角層の障害部位から侵入して角化細胞を刺激して惹起する炎症と考えられている。ACD は、IV 型遅延性アレルギーの一種であり、職業的な皮膚病の主因となっている。ACD の発症には、ハプテンを捕獲した抗原提示細胞が、所属リンパ節に遊走し抗原情報を T リンパ球に伝えて感作リンパ球が誘導される感作相と感作成立後にハプテンが再び接触することにより、感作 T 細胞が活性化されて表皮に炎症をおこす惹起相があるとされる¹⁻⁴⁾。

ACD の研究に、マウスを用いた接触過敏症（contact hypersensitivity; CHS）は、よく使用されるモデル動物実験系である^{5,6)}。ハプテンとして、ジニトロフルオロベンゼン（dinitrofluorobenzene; DNFB）、トリニトロクロロベンゼン（trinitrochlorobenzene;

TNCB）、オキサゾロン（oxazolone）、フルオレセインイソチオシアネート（fluorescein isothiocyanate; FITC）などの自己タンパク質と化学的に反応性の高い有機低分子が用いられる。実験系では、まず、有機溶媒とオリーブ油に溶かしたハプテンを除毛したマウスの胸部に塗布する（感作相）。5-7 日後に、耳介に同じハプテンをチャレンジすることでアレルギー性の炎症による耳介の腫れが惹起する（惹起相）。この耳介の腫れは、24-48 時間後をピークとして観察され、その程度を指標として CHS 評価が行われる。

今までに CHS モデル動物実験系を用いた報告では、チャレンジするハプテンの量と回数は様々であり、その影響を詳細に検討した報告はみられない。そこで本研究では、ハプテンとして最もよく使用される DNFB を使用して、耳介にチャレンジする濃度と回数が CHS 反応に与える影響について検討した。さらに、免疫組織化学的手法を用いて CHS による耳介の炎症状態について評価をおこなった。

*1 川崎医療福祉大学大学院 医療技術学研究科 健康科学専攻 *2 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科
（連絡先）長野隆男 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学
E-mail : naganot@mw.kawasaki-m.ac.jp

2. 研究方法

2.1 試薬

2,4-Dinitrofluorobenzene は、関東化学から購入した。

2.2 マウス

6週齢雌 BALB/c マウスを日本エスエルシーから購入した。マウスには、F2PLD1(オリエンタル酵母)と酸性水を自由摂取させた。実験は、コントロール群 (n=3), 0.15%DNFB 群 (n=6), 0.3%DNFB 群 (n=6), 0.5%DNFB 群 (n=6) の4群でおこなった。なお、本動物実験は、川崎医療福祉大学動物実験委員会(承認番号:13-011), 及び川崎医科大学動物実験委員会(承認番号:14-019)の承認を得て実施した。

2.3 CHS モデル動物実験系

実験スケジュールを図1に示す。まず、マウスの胸部の毛をトリマーで剃った。感作は、毛を剃った胸部に0.5% DNFB (アセトン:オリーブ油 (4:1) に溶解) 50 μ L / 匹を滴下し、実験0日目と1日目に合計2回おこなった。ここで、コントロール群は溶媒のみで感作した。耳介にチャレンジする DNFB 濃度は、コントロール群で0%, 0.15%DNFB 群で0.15%, 0.3%DNFB 群で0.3%, 0.5%DNFB 群で0.5%とした。チャレンジは、DNFB をマウス耳介の背側部分(両耳)に20 μ L ずつ、計40 μ L / 匹を滴下し、実験5日目、12日目、19日目の合計3回おこなった。また、すべての操作は、セボフレン吸入麻酔剤を使用して麻酔下でおこなった。

2.4 耳介の腫れ測定

耳介の腫れは、チャレンジ24時間後の耳介の厚みからチャレンジ前の耳介の厚みを差し引いて求め

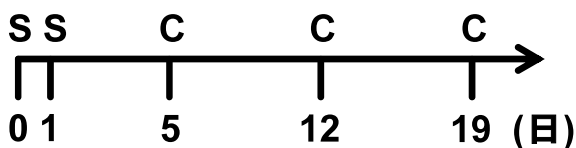


図1 CHS 実験プロトコール

実験0日目と1日目にマウス胸部に0.5% DNFB で感作 (S) をおこない、実験5日目、12日目、19日目にマウス耳介に異なる DNFB 濃度でチャレンジ (C) を行った。なお、コントロール群では、感作とチャレンジは溶媒のみで行った。

た。耳介の厚みは、マイクロメータ (ソフトタッチ マイクロ CLM, ミットヨ) を使用して測定した。

2.5 耳介の組織観察

3回目のチャレンジをおこなった24時間後の実験20日目に耳介を採取し、IHC Zinc Fixative (日本ベクトン・ディッキンソン) で24時間固定をおこないパラフィン包埋切片 (3 μ m) を作製した。組織切片は、ヘマトキシリン・エオジン (HE) と免疫組織化学 (immunohistochemistry; IHC) で染色を行った。HE 染色をおこなった耳介組織は、10倍対物レンズを使用して光学顕微鏡で組織観察した。

2.6 IHC 染色

IHC 染色は、ベンタナ XT システム ディスカバリー (ロシュ・ダイアグノスティックス) を使用しておこなった。一次抗体として anti-mouse Ly-6G (Gr-1) 抗体 (eBioscience) を用い、二次抗体として biotin mouse anti-rat IgG2b (日本ベクトン・ディッキンソン) を使用した。また、ヘマトキシリンで核の染色をおこなった。IHC で染色した組織は、40倍対物レンズを使用して光学顕微鏡で観察し、210 μ m 四方中の染色された細胞を数え、1切片につき5箇所細胞数を求めた。

2.7 統計解析

結果は、平均値と標準偏差で示した。統計解析には、Origin 8.5J (OriginLab) を使用し、2群の比較には t 検定を用いた。3群以上の比較には一次元配置分散分析を行い、その後に Tukey 検定でポストホックテストをおこなった。

3. 研究結果

3.1 マウスの体重

実験開始時と終了時の各群におけるマウスの体重を測定した (表1)。その結果、実験開始時と終了時で、各群間での有意な差は観察されなかった。このことから、チャレンジした DNFB 濃度の違いはマウスの体重に影響を与えないと考えられた。

3.2 耳介の腫れの評価

DNFB の濃度を変えてマウス耳介にチャレンジし、24時間後の耳介の腫れを評価した。まず、1回目のチャレンジを行ない耳介の腫れを測定した結果、コントロール群で -0.001 ± 0.005 mm, 0.15% DNFB 群で 0.058 ± 0.021 mm, 0.3% DNFB 群で 0.099

表1 マウスの体重 (g)

	コントロール	0.15%DNFB 群	0.3%DNFB 群	0.5%DNFB 群
実験開始時	19.8 \pm 0.8	20.1 \pm 0.8	20.1 \pm 0.6	18.7 \pm 1.0
実験終了時	20.1 \pm 0.8	20.6 \pm 0.6	20.1 \pm 0.7	19.8 \pm 0.8

*数値は、平均値と標準偏差を示す。

$\pm 0.019\text{mm}$, 0.5% DNFB 群で $0.224 \pm 0.028\text{mm}$ であった (図2A)。

次に, 2回目のチャレンジを行ない耳介の腫れを測定した結果, コントロール群で $0.007 \pm 0.006\text{mm}$, 0.15% DNFB 群で $0.218 \pm 0.020\text{mm}$, 0.3% DNFB 群で $0.243 \pm 0.040\text{mm}$, 0.5% DNFB 群で $0.376 \pm 0.040\text{mm}$ であった。0.15% DNFB 群と0.3% DNFB 群では有意な差は認められなかった (図2B)。0.5% DNFB 群で多くのマウスの耳介に水疱が観察され耳介の厚み測定は困難であった。

さらに, 3回目のチャレンジを行ない耳介の腫れを測定した結果, コントロール群で $0.006 \pm 0.005\text{mm}$, 0.15% DNFB 群で $0.196 \pm 0.014\text{mm}$, 0.3% DNFB 群で $0.311 \pm 0.044\text{mm}$, 0.5% DNFB 群で $0.951 \pm 0.261\text{mm}$ であった (図2C)。0.3% DNFB 群でマウスの耳介に水疱が観察され, 耳介の厚み測定に支障をきたす個体が見られた。0.5% DNFB 群では, 耳介で苔癬化が進んでおり, 測定値に大きなバラツキが生じた。

3.3 耳介の組織観察

マウス耳介から組織切片を作製し, HE 染色後に組織観察を行った (図3)。コントロール群と比較して, 0.15% DNFB 群, 0.3% DNFB 群, 0.5% DNFB 群で CHS により耳介組織が腫れている様子が観察された。0.15% と0.3% DNFB 群では, 組織の腫れに大きな差は見られなかった。0.5% DNFB 群では, 耳介組織の苔癬化が進んでいたことから IHC 染色は困難と判断した。

3.4 IHC 染色

抗 Gr-1抗体を用いて耳介組織に浸潤した炎症細胞の IHC 染色を行った (図4)。画像で, 青色に染まった部分はヘマトキシリンで染色された核であり, 褐色に染まった部分は耳介組織に浸潤した炎症細胞と考えられる。IHC 染色された細胞の数は, 0.15% DNFB 群で 166 ± 59 個/ mm^2 , 0.3% DNFB 群で 253 ± 59 個/ mm^2 であった。0.3% DNFB 群は, 0.15% DNFB 群と比較して耳介組織に浸潤した炎症細胞の数の有意な増加がみられた (図5)。

4. 考察

マウスを用いた CHS は, ヒト ACD のモデル動物実験系として有用と考えられている^{5,6)}。本研究では, ハプテンとして報告が最も多い DNFB を用い, 耳介にチャレンジする DNFB の濃度と回数が CHS に与える影響について検討した。CHS の評価は, 1) 耳介の腫れ, 2) 耳介組織の観察, 3) 耳介組織に浸潤した炎症細胞についておこなった。

耳介に異なる濃度の DNFB をチャレンジし, 24

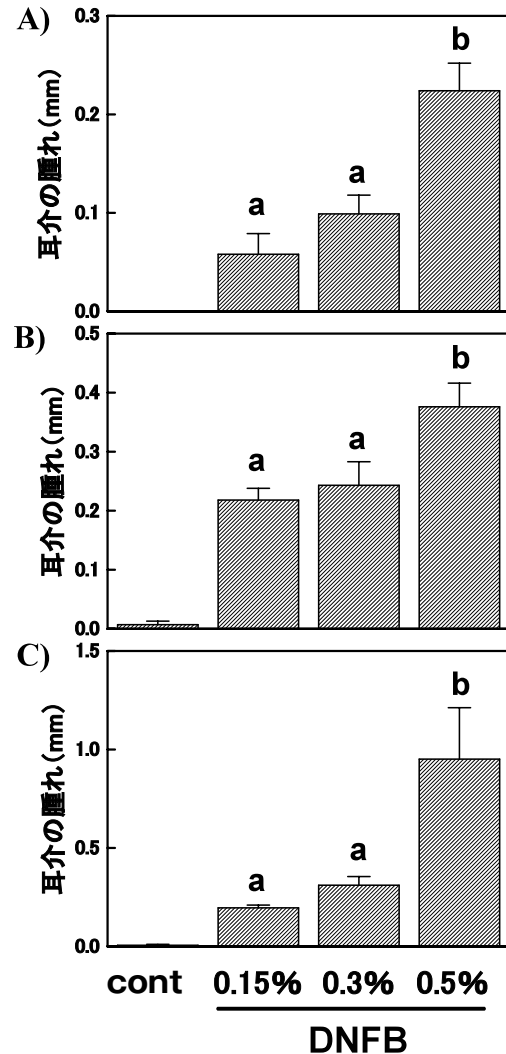


図2 DNFB 濃度とチャレンジの回数が耳介の腫れに与える影響

A) 1回チャレンジ24時間後, B) 2回チャレンジ24時間後, C) 3回チャレンジ24時間後. cont: コントロール群, 0.15%:0.15% DNFB 群, 0.3%:0.3% DNFB 群, 0.5%:0.5% DNFB 群. 耳介の腫れは, チャレンジ24時間後の耳介の厚みからチャレンジ前の耳介の厚みを差し引いて求めた。数値は, 平均値と標準偏差を示す。検定は, DNFB をチャレンジした3群で行った。異なるアルファベットは有意差 ($p < 0.01$) があることを示す。

時間後の CHS による耳介の腫れを比較した。1回目のチャレンジをおこなった結果, 耳介の腫れの平均値は0.15%と0.3% DNFB 群で0.1mm 以下であり, 0.5% DNFB 群で0.2mm を超えた。この結果から, 0.15%と0.3% DNFB 群はさらにチャレンジが必要であり, 0.5% DNFB 群は1回目のチャレンジで CHS 評価が可能であると考えられた。次に, 2回目のチャ

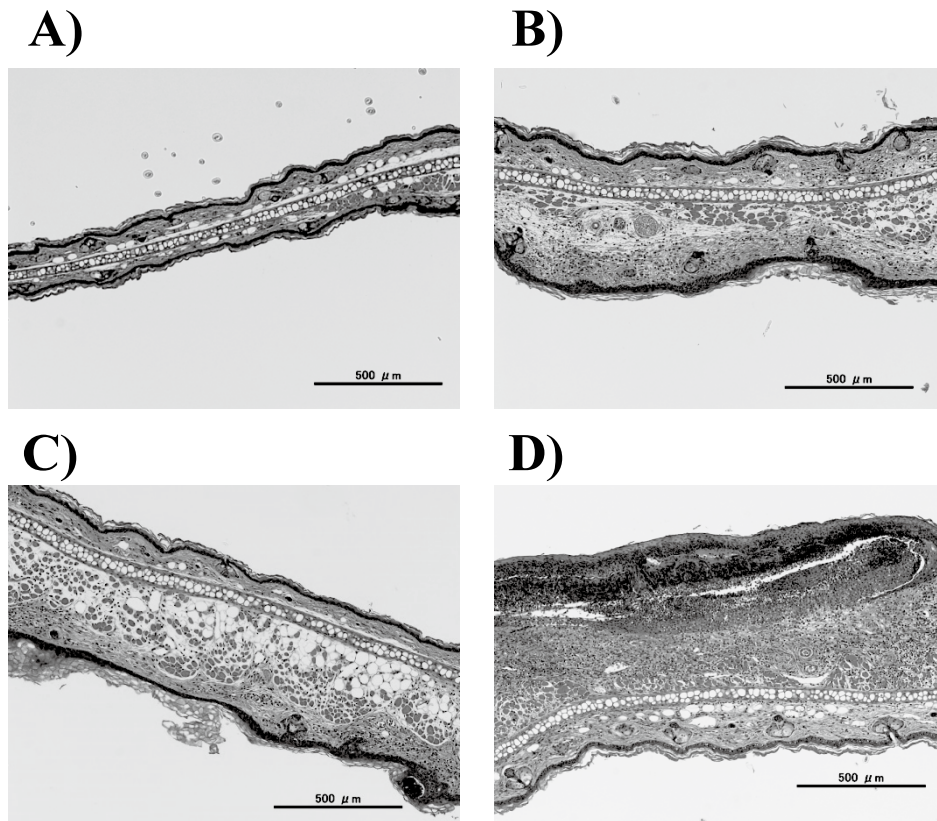


図3 HE 染色画像

A) コントロール群, B) 0.15% DNFB 群, C) 0.3% DNFB 群, D) 0.5% DNFB 群. 耳介組織を IHC Zinc Fixative で固定した後パラフィン包埋切片を作製した. バーは500 μ m を示す.

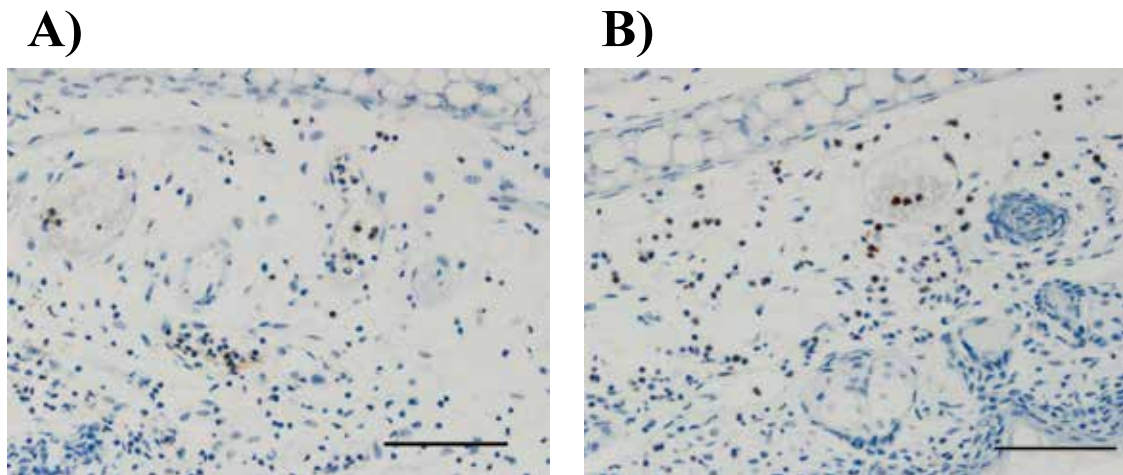


図4 IHC 染色画像

A) 0.15% DNFB 群, B) 0.3% DNFB 群. 抗 Gr-1抗体を使用して IHC をおこなった. バーは100 μ m を示す.

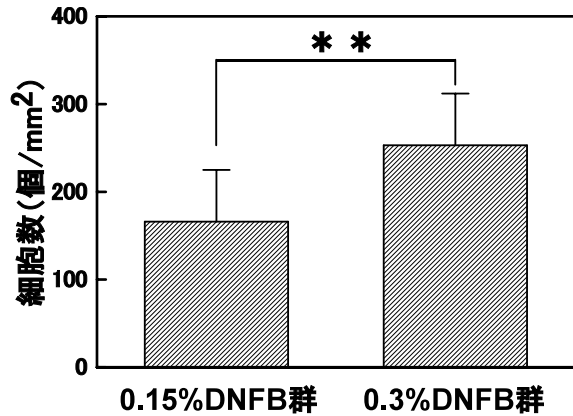


図5 耳介に浸潤した炎症細胞数

光学顕微鏡下で IHC 染色された細胞を数え、単位面積当たりの細胞数を求めた。数値は、平均値と標準偏差を示す。** $p<0.01$ 。

レンジをおこなった結果、耳介の腫れの平均値は 0.15% と 0.3% DNFB 群でどちらも 0.2mm 以上となった。また、0.15% と 0.3% DNFB 群で耳介の腫れに有意な差は認められなかった。一方、0.5% DNFB 群の耳介の腫れの平均値は 0.376mm と高値ではあったが、多くのマウス耳介で水疱ができており、耳介の厚み測定による評価は困難な状態であった。この結果から、0.15% と 0.3% DNFB 群では 2 回目のチャレンジで CHS 評価が可能となり、0.5% DNFB 群では 2 回チャレンジをおこなうと CHS 評価は難しくなると考えられた。さらに、3 回目のチャレンジをおこなった結果、0.15% と 0.3% DNFB 群で耳介の腫れに有意な差はなく、どちらも 2 回目のチャレンジをおこなった結果と比べて差は観察されなかった。また、0.3% DNFB 群でマウスの耳介に水疱ができ耳介の厚み測定に支障をきたす個体が見られた。以上の結果から、0.15% と 0.3% DNFB は 2 回のチャレンジで、0.5% DNFB は 1 回のチャレンジで CHS 評価をすることが望ましいことが示された。

Inagaki and Nagai⁵⁾ は、0.15% DNFB を 5 回チャレンジして CHS 評価する方法を提唱している。Bhol and Schechter⁷⁾ は、0.2% DNFB を 2 回チャレンジして CHS 評価をおこなった。この Bhol and Schechter の方法を用いて、Yuan ら⁸⁾ と Ishida ら⁹⁾ は CHS 評価をおこなっている。Tüting のグループ^{10,11)} は、0.3% DNFB を 2 回または 3 回チャレンジして CHS 評価をおこなった。さらに、Sugawara のグループ^{12,13)} は、0.5% DNFB を 1 回チャレンジする方法で

CHS 評価をおこなった。すなわち、CHS モデル動物実験系を用いた先行研究において、0.5% DNFB では 1 回のチャレンジで、0.15% から 0.3% DNFB では数回のチャレンジで CHS 評価を行っている。そのため、我々の結果は、先行研究と矛盾がない結果と考えられる。

本研究では、HE 染色と IHC 染色をおこない 3 回チャレンジをおこなった耳介組織を評価した。HE 染色後に耳介組織を観察したところ、0.15% と 0.3% DNFB 群で耳介組織の腫れに大きな差は見られなかった。一方、耳介組織中の IHC 染色された細胞数を測定したところ、0.3% DNFB 群は 0.15% DNFB 群と比べて有意な細胞数の増加がみられた。CHS の惹起相では、ハプテンが再び皮膚表面に接触すると表皮細胞からサイトカインやケモカインの産生がみられる。続いて、血管の拡張と内皮細胞の活性化がおこり、好中球や好酸球などの炎症細胞が耳介組織に浸潤して炎症状態となる⁶⁾。抗 Gr-1 抗体を使用するとこの耳介組織に浸潤した炎症細胞を特異的に染色することができる¹⁰⁾。さらに、本研究で耳介の腫れを測定した結果においても、0.15% と 0.3% DNFB 群で有意な差は見られなかった。これらの結果から、抗 Gr-1 抗体を使用した IHC 染色は、CHS 評価をするうえで有用な研究方法と考えられる。

5. 結論

耳介の腫れを指標とした結果、0.15% と 0.3% DNFB は 2 回のチャレンジで、0.5% DNFB は 1 回のチャレンジで CHS 評価をすることが望ましいことが示された。次に、耳介組織を HE と IHC で染色した。IHC 染色では抗 Gr-1 抗体を使用して耳介組織に浸潤した炎症細胞を染色した。その結果、HE 染色では 0.15% と 0.3% DNFB 群で耳介組織の腫れに大きな差は認められなかった。一方、IHC 染色では、0.3% DNFB 群は 0.15% DNFB 群と比べて耳介組織に浸潤した炎症細胞の数に有意な増加が見られた。従って、抗 Gr-1 抗体を使用した IHC 染色は、CHS 評価をするうえで有用な研究方法と考えられた。

謝 辞

本研究は、平成 25 年度医療福祉研究費（川崎医療福祉大学）によって実施された。

文 献

- 1) 矢上晶子, 松永佳世子: 接触皮膚炎。西間三馨, 秋山一男, 太田健編, アレルギー総合ガイドライン 2013, 初版,

- 協和企画, 東京, 358–367, 2013.
- 2) Kaplan DH, Igyarto BZ and Gaspari AA: Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nature Reviews Immunology*, **12**, 114–124, 2012.
 - 3) Peiser M, Tralau T, Heidler J, Api AM, Arts JHE, Basketter DA, English J, Diepgen TL, Fuhlbrigge RC, Gaspari AA, Johansen JD, Karlberg AT, Kimber I, Lepoittevin JP, Liebsch M, Maibach HI, Martin SF, Merk HF, Platzek T, Rustemeyer T, Schnuch A, Vandebriel RJ, White IR and Luch A: Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **69**(5), 763–781, 2012.
 - 4) Vocanson M, Hennino A, Rozières A, Poyet G and Nicolas JF: Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*, **64**(12), 1699–1714, 2009.
 - 5) Inagaki N and Nagai H: Analysis of the mechanism for the development of allergic skin inflammation and the application for its treatment: mouse models for the development of remedies for human allergic dermatitis. *Journal of Pharmacology Sciences*, **110**, 251–259, 2009.
 - 6) Honda T, Egawa G, Grabbe S and Kabashima K: Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: Toward the understanding of allergic contact dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, **133**, 303–315, 2013.
 - 7) Bhol KC and Schechter PJ: Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis. *British Journal of Dermatology*, **152**(6), 1235–1242, 2005.
 - 8) Yuan XY, Liu W, Zhang P, Wang RY and Guo JY: Effects and mechanisms of aloe vera on 2,4-dinitrofluorobenzene-induced allergic contact dermatitis in BALB/c mice. *European Journal of Pharmacology*, **629**(1–3), 147–152, 2010.
 - 9) Ishida T, Nishiumi S, Tanahashi T, Yamasaki A, Yamazaki A, Akashi T, Miki I, Kondo Y, Inoue J, Kawauchi S, Azuma T, Yoshida M and Mizuno S: Linoleoyl ethanolamide reduces lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages and ameliorates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact dermatitis in mice. *European Journal of Pharmacology*, **699**(1–3), 6–13, 2013.
 - 10) Karsak M, Gaffal E, Date R, Wang-Eckhardt L, Rehnelt J, Petrosino S, Starowicz K, Steuder R, Schlicker E, Cravatt B, Mechoulam R, Buettner R, Werner S, Marzo VD, Tüting T and Zimmer A: Attenuation of Allergic Contact Dermatitis Through the Endocannabinoid System. *Science*, **316**(5830), 1494–1497, 2007.
 - 11) Gaffal E, Cron M, Glodde N and Tüting T: Anti-inflammatory activity of topical THC in DNFB-mediated mouse allergic contact dermatitis independent of CB1 and CB2 receptors. *Allergy*, **68**(8), 994–1000, 2013.
 - 12) Duan J, Sugawara T, Sakai S, Aida K and Hirata T: Oral glucosylceramide reduces 2,4-dinitrofluorobenzene induced inflammatory response in mice by reducing TNF-alpha levels and leukocyte infiltration. *Lipids*, **46**(6), 505–512, 2011.
 - 13) Sakai S, Sugawara T and Hirata T: Inhibitory effect of dietary carotenoids on dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity in mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **75**(5), 1013–1015, 2011.

(平成27年5月18日受理)

Effect of Dinitrofluorobenzene on Contact Hypersensitivity in Mice

Wuruna WU, Mutsuko TAKEMASA and Takao NAGANO

(Accepted May 18, 2015)

Key words : contact hypersensitivity, dinitrofluorobenzene, ear swelling, immunohistochemistry

Abstract

Contact hypersensitivity (CHS) is frequently used an experimental model system for human allergic contact dermatitis. In the present study, we investigated the effects of the concentration of dinitrofluorobenzene (DNFB) and the number of DNFB-challenge to evaluate CHS responses. The results of the ear swelling showed that one challenge for 0.5% DNFB and two times challenges for 0.15% and 0.3% DNFB were recommended. Mouse ear tissue was stained by hematoxylin and eosin (HE) and immunohistochemistry (IHC). IHC was conducted using anti-Gr-1 antibody which stained infiltrated inflammatory cells into the skin. The extent of the ear swelling was not different between 0.15% and 0.3% DNFB-challenged mice in HE stained tissue. In contrast, the number of infiltrated cells into the skin of 0.3% DNFB-challenged mice was significantly more than those of 0.15% DNFB-challenged mice in IHC stained tissue. These results suggest that IHC is a useful method to evaluate the CHS responses.

Correspondence to : Takao NAGANO

Department of Clinical Nutrition

Faculty of Health Science and Technology

Kawasaki University of Medical Welfare

Kurashiki, 701-0193, Japan

E-mail : naganot@mw.kawasaki-m.ac.jp

(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.25, No.1, 2015 113 – 119)

